

• 基础实验研究论著 •

MYCT-1 基因慢病毒表达载体的构建及鉴定

张 昊^{1,2}, 邱广斌^{1,2}, 翟如波²

(1. 吉林大学第一临床医院, 吉林长春 130000; 2. 中国人民解放军第二〇二医院检验科, 辽宁沈阳 110003)

摘要:目的 构建携带 MYCT-1 基因的重组慢病毒载体 GV218-MYCT-1, 并包装成慢病毒, 为进一步研究及动物实验奠定基础。方法 MYCT-1 基因片段经 PCR 扩增后, 与酶切线性化的慢病毒载体进行定向连接, 获得 GV218-MYCT-1 重组慢病毒载体并转化细菌感受态细胞。克隆菌落行 PCR 鉴定, 对阳性的重组质粒进行测序并转入 293T 细胞, 荧光显微镜下观察 GFP 表达并行 Western blot 鉴定。将重组质粒与慢病毒包装系统一同转染 293T 细胞进行病毒包装, 实时荧光定量 PCR 法检测病毒滴度。结果 DNA 测序结果及 Western blot 鉴定证实成功构建 MYCT-1 重组慢病毒载体, 对其进行包装后测定慢病毒滴度为 2×10^8 TU/mL。结论 成功构建并包装 MYCT-1 重组慢病毒表达载体。

关键词: MYCT-1 基因; 慢病毒载体; 胃肿瘤

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.12.005

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)12-1503-02

Construction and identification of lentiviral expression vector of MYCT-1 gene

Zhang Hao^{1,2}, Qiu Guangbin^{1,2}, Zhai Rubo²

(1. the First Clinical Hospital of Jilin University, Changchun, Jilin 130000, China; 2. Department of Clinical Laboratory, the 202nd Hospital of Chinese People's Liberation Army, Shenyang, Liaoning 110003, China)

Abstract: Objective To construct recombinant MYCT-1 gene-carried lentiviral vector GV218-MYCT-1 and then packaged it into lentivirus in order to lay a foundation for further studies and animal experiments. **Methods** Fragments of MYCT-1 gene was amplified by PCR, linked with digested and linearized lentiviral vector directionally, and then recombinant GV218-MYCT-1 lentivirus was obtained and transformed into bacterial competent cells. Bacterial colonies were identified by PCR and the positive recombinant plasmid were sequenced and transformed into 293T cells. GFP expression was observed by fluorescence microscopy and identified by Western blot. Recombinant plasmid and lentiviral packaging system were transfected into 293T cells simultaneously for virus packaging. Virus titers were detected by real-time fluorescent quantitative PCR. **Results** Recombinant MYCT-1 lentiviral vector was confirmed to be successfully constructed by DNA sequencing results and Western blot identification. The lentivirus titer was 2×10^8 TU/mL after its packaging. **Conclusion** Recombinant MYCT-1 lentiviral expression vector has been successfully constructed and packaged.

Key words: MYCT-1 gene; lentiviral vector; stomach neoplasma

MYCT-1(myoc target)基因是本室克隆的一个新基因, 研究表明 MYCT-1 在多种肿瘤组织中表达降低, 可能是一个新的抑癌基因^[1]。为了进一步探讨 MYCT-1 的基因功能及其在肿瘤发生中的可能机制, 在本研究中, 笔者设计并构建携带有 MYCT-1 基因的慢病毒表达载体, 并对其进行包装以获得足够转染滴度的病毒颗粒, 为后期的动物实验及进一步研究创造了条件。

1 材料与方

1.1 材料 慢病毒载体系统和慢病毒的包装细胞 293T 细胞(上海吉凯基因化学技术有限公司); dNTP(Takara); 琼脂糖(赛百盛公司); 质粒抽提试剂盒(Promega 公司); Taq 酶(Sino-Bio 公司); 胎牛血清 FBS(上海微科生化试剂有限公司); DM-SO(上海生物试剂厂); DMEM(GIBCO 公司); 胰酶(上海化学试剂公司); 台盼蓝(上海捷倍思基因技术); Lipofectamine 2000(Invitrogen 公司); 限制性内切酶(NEB 公司)。

1.2 方法

1.2.1 MYCT-1 基因片段的克隆 由上海吉凯基因化学技术有限公司设计并合成引物, 引物序列如下: 上游引物: 3'-GAG GAT CCC CGG GTA CCG GTC GCC ACC ATG CGA ACA CAA

GTA TAT GAG G-5'; 下游引物: 3'-TCA CCA TGG TGG CGA CCG GGG AAT CTG GGA ATG CCT TGA-5'。引物序列中引入了交换配对碱基和酶切位点, 通过 PCR 法扩增目的基因片段, 扩增条件为: 94 °C 5 min, 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 2 min, 进行 30 个循环后, 72 °C 延伸 10 min。

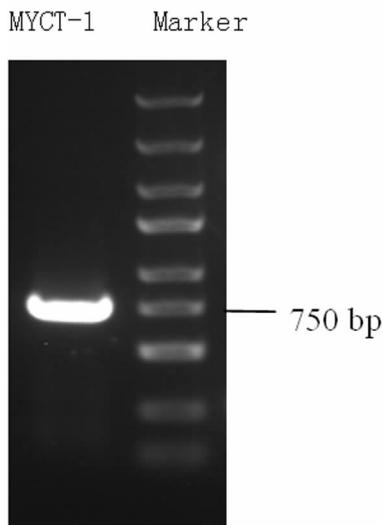
1.2.2 MYCT-1 重组慢病毒载体构建 将获得的基因片段与经酶切线性化的 GV218 载体以 1:3~1:9 的摩尔比加入反应体系进行定向连接, 于 25 °C 反应 30 min 后于 42 °C 反应 15 min 制备克隆交换液, 将产物转化至大肠杆菌感受态细胞, 最后将已转化的感受态细胞转移至 LB 琼脂培养基上, 37 °C 培养 16 h。PCR 法进行鉴定, 鉴定引物 Ubi-F: 5'-GGG TCA ATA TGT AAT TTT CA GTG-3'; EGFP-N-R: 5'-CTG GTC GAG CTG GAC GGC GAC G-3'。将阳性克隆菌液送公司测序并进行结果比对。

1.2.3 GV218-MYCT-1 慢病毒过表达质粒蛋白表达检测 将 GV218-MYCT-1 慢病毒过表达质粒转染 293T 细胞, 24 h 后荧光显微镜下观察细胞荧光表达情况。收集细胞, 提取蛋白, Western blot 方法检测转染 293T 细胞样品中 MYCT-1-GFP 融合蛋白的表达。

1.2.4 病毒包装、纯化及滴度测定 将编码慢病毒颗粒的重组 GV218-MYCT-1 质粒及其两种辅助包装原件载体质粒 pHelper 1.0 和 pHelper 2.0, 三种质粒载体分别进行高纯度无内毒素抽提, 按 Invitrogen 公司 Lipofectamine 2000 使用说明进行共转染 293T 细胞, 转染后 8 h 更换为完全培养基, 培养 48 h 后, 收集富含慢病毒颗粒的细胞上清液, 对其浓缩后得到高滴度的慢病毒浓缩液, 在 293T 细胞中以实时荧光定量 PCR (RT-PCR) 法进行滴度测定并标定病毒滴度。

2 结 果

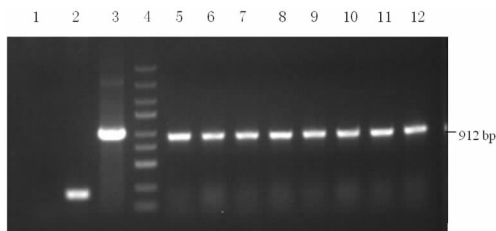
2.1 MYCT-1 扩增产物凝胶电泳结果 获得约 751 bp 大小 PCR 产物, 见图 1。



Marker: 标记物, 自上而下依次为 5 kb, 3 kb, 2 kb, 1.5 kb, 1 kb, 750 bp, 500 bp, 250 bp, 100 bp。

图 1 目的基因 PCR 产物电泳图

2.2 GV218-MYCT-1 过表达质粒慢病毒的阳性克隆鉴定 阳性转化子 PCR 产物大小为 912 bp, 阴性转化子 PCR 产物大小为 198 bp, 见图 2。测序结果与目标序列比对完全一致。



1: 阴性对照 (ddH₂O); 2: 阴性对照 (空载自连对照组); 3: 阳性对照 (GAPDH); 4: 标记物, 自上而下依次为 5 kb, 3 kb, 2 kb, 1.5 kb, 1 kb, 750 bp, 500 bp, 250 bp, 100 bp; 5~12: MYCT1 1~8 号转化子。

图 2 GV218-MYCT-1 过表达质粒慢病毒的阳性克隆 PCR 鉴定

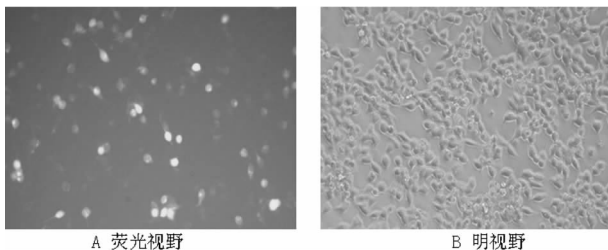
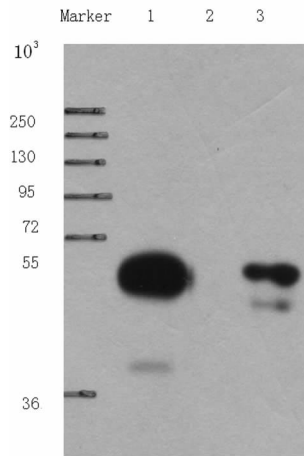


图 3 质粒转染 293T 细胞 24 h 荧光表达情况 (×200)

2.3 GV218-MYCT-1 重组质粒 293T 细胞蛋白表达 转染后, 细胞内可观察到明显的荧光, 说明目的质粒转染正常、目的质粒荧光标记基因表达正常, 见图 3。转染 293T 的样品经 Western blot 检测, 可以观察到 52×10³ 附近有特征条带, 其大小和目的基因融合蛋白相吻合, 见图 4。在本次滴度检测中, 1×10⁻⁴ μL 组样品和对照组样品的 Ct 值存在 2 个左右差异, 认为在 1×10⁻⁴ μL 组样品中存在病毒颗粒。假定该组样品含有至少有 1 个病毒颗粒, 则病毒的滴度为 2×10⁸ TU/mL, 见表 1。



Marker: 标记物; 1: 阳性 WB 标准品 SURVIVIN-3FLAG-GFP (48×10³); 2: 对照组 293T 细胞; 3: 目的基因质粒转染 293T 后样品。

图 4 Western blot 质粒转染 293T 样品

表 1 不同浓度病毒感染后样品组的 Ct 值及表达量分析

组别	Ct _{Actin}	Ct _{目标基因}	Ct _{目标基因} 均值	ΔCt*	ΔCt _{对照 - ΔCt_{样品组}}
对照组	13.78	34.34	33.555	19.775	0.000
		32.77			
样品组	14.39	20.97	21.02	6.630	13.145
		21.07			
10 ⁻¹ μL	14.17	23.72	23.72	9.550	10.225
		23.72			
10 ⁻² μL	14.28	26.5	26.485	12.205	7.570
		26.47			
10 ⁻³ μL	14.06	29.71	29.605	15.545	4.230
		29.50			
10 ⁻⁴ μL	14.08	31.49	31.37	17.290	2.485
		31.25			
10 ⁻⁵ μL	13.93	32.71	33.2	19.270	0.505
		33.69			

* : ΔCt = Ct_{目标基因} 均值 - Ct_{Actin}。

3 讨 论

MYCT-1 是本室克隆的一个新基因, 为原癌基因 c-Myc 的一个靶基因。c-Myc 是一个含亮氨酸拉链的转录因子, 通过大量靶基因如 CAD, ODC, LDH-A, cyclin E, MrDb, telomerase/hTERT, rcl, IRP2, cdc25A, JPO1 可广泛(下转第 1507 页)

SBEM 水平,结果提示血清 SBEM 水平变化与肿瘤负荷化疗效果之间具有密切关系。NAC 有效的直接效应为肿瘤细胞坏死,造成肿瘤负荷减轻。效果为 CR 患者的肿瘤负荷下降更为明显可能是血清 SBEM 水平降低更为显著的直接原因。手术后 3 组间血清 SBEM 水平无显著性差异,可能与病灶切除后肿瘤负荷降至较为一致水平有关。

肿瘤最大径间接反映肿瘤负荷,直径愈大则肿瘤体积愈大、肿瘤细胞数目愈多、肿瘤细胞 SBEM 释放入血的概率愈高,在对 SBEM 的下降率进行分层分析时发现,NAC 后血清 SBEM 下降率与肿瘤最大径和 NAC 效果有关,直径愈大 SBEM 下降率愈高,这也说明体积愈大的肿瘤从新辅助化疗中获益的概率愈高,故对于肿瘤负荷较大的患者更应实施 NAC。NAC 后 SBEM 下降率与临床分期、组织学分级、淋巴结状态、年龄、月经状态、基因分型、病理学类型、ER、Her-2、P53、Ki-67、基因分型等无关,提示 SBEM 下降率可能为独立于上述因素的可以反映 NAC 效果的分子标志物。此外在研究时发现,随临床分期升高,NAC 后 SBEM 下降率有增加趋势,但差异无统计学意义,需增加病例数进一步研究。

Miksicek 等^[1]将 SBEM 用于检测乳腺癌骨髓孤立肿瘤细胞,结果显示:SBEM 在 ER(+),分化较好的“Luminal 亚型”MCF-7, T-47D 和 ZR-75-1 乳腺癌细胞中有表达,但在 ER(-),分化较差的“基底样亚型”MDA-MB-231 乳腺癌细胞中无表达,并在 ER(-)的亚组中显示出预后价值^[6]。但本研究未发现 SBEM 水平及其下降率在不同分子分型乳腺癌中的差异,有待于进一步积累病例研究明确。

综上所述,血清 SBEM 水平变化与 NAC 化疗反应性有关,可作为 NAC 疗效评价的一个有益补充,指导个体化治疗

方案的制定。但血清 SBEM 水平及 NAC 后 SBEM 下降率能否作为乳腺癌预后的判断因素及 SBEM 与乳腺癌微转移的关系有待于进一步研究明确。相信随着临床研究和医学转化性研究的不断深入,SBEM 在乳腺癌疗效预测及预后中的价值会得到进一步证实。

参考文献

- [1] Miksicek RJ, Myal Y, Watson PH, et al. Identification of a novel breast and salivary gland-specific, mucin-like gene strongly expressed in normal and tumor human mammary epithelium[J]. *Cancer Res*, 2002, 62(10): 2736-2740.
- [2] Liu ZZ, Xie XD, Qu SX, et al. Small breast epithelial mucin (SBEM) has the potential to be a marker for predicting hematogenous micrometastasis and response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer[J]. *Clin Exp Metastasis*, 2010, 27(4): 251-259.
- [3] 刘兆喆,郭放,李兵,等. SBEM 和 hMAM 在乳腺癌中的表达及临床意义[J]. *临床肿瘤学杂志*, 2012, 17(9): 809-813.
- [4] Skliris GP, Hubé F, Gheorghiu I, et al. Expression of small breast epithelial mucin(SBEM) protein in tissue microarrays (TMAs) of primary invasive breast cancers[J]. *Histopathology*, 2008, 52(3): 355-369.
- [5] 陈忠,陈聆,孟凡祥,等. 乳腺癌患者外周血 SBEM mRNA 的表达及意义[J]. *国际检验医学杂志*, 2012, 33(19): 2327-2328.
- [6] 崇梅红,王水,查小明,等. 实时荧光定量 PCR 法检测乳腺癌外周血循环肿瘤细胞的临床价值[J]. *南京医科大学学报:自然科学版*, 2012, 32(2): 220-225.

(收稿日期:2012-12-24)

(上接第 1504 页)

参与细胞转化、细胞分化、凋亡及细胞周期调控^[2-3],并与多种肿瘤的形成相关。在前期研究中,利用 RNA 干扰技术将胃黏膜 GES-1 细胞中 MYCT-1 基因沉默,发现 MYCT-1 表达降低虽然不能直接导致正常胃黏膜细胞恶性转化,但引起胃癌细胞增殖减慢,凋亡增加,细胞周期 S 期延长,提示 MYCT-1 基因的功能可能是抑制细胞 DNA 合成^[1]。

慢病毒载体是以人类免疫缺陷型病毒(HIV)为基础发展起来的基因治疗载体系统,它能高效地将目的基因导入动物和人的原代细胞或细胞系中,对分裂细胞和非分裂细胞均具有感染能力。慢病毒载体基因组是正链 RNA,其进入细胞后,在细胞质中被其自身携带的反转录酶反转录,形成 DNA 整合前复合体,进入细胞核后,DNA 整合到细胞基因组中。整合后的 DNA 转录 mRNA,回到细胞质中,表达目的蛋白。因目的基因整合到宿主细胞基因组中,并随细胞基因组的分裂而分裂,因此慢病毒载体介导的基因表达作用持续且稳定,且感染效率高,能够被浓缩成高滴度,不易诱发宿主免疫反应,可在体内长期表达,具有安全性好等优点,优于腺病毒和逆转录病毒^[4],已成为当前基因转移载体研究的热点^[5]。

本研究所采用的慢病毒载体系统由 GV218 载体、pHelper1.0 载体及 pHelper2.0 载体三质粒组成。其中 GV218 载体是进行基因重组的靶载体;pHelper1.0 载体提供编码病毒所

需的结构蛋白和特异性酶;pHelper2.0 载体则提供包装病毒所需的包膜蛋白。本实验将 MYCT-1 基因与酶切后的慢病毒载体进行定向连接,成功构建出 MYCT-1 重组慢病毒表达载体,并通过三质粒共转染 293T 细胞成功包装慢病毒,获得可供后续实验转染用的滴度,为后续的动物实验及进一步研究该基因在肿瘤治疗及发生中的作用奠定了良好的基础。

参考文献

- [1] 梅旭,刘政,邱广斌. MYCT-1 基因真核表达载体的构建及鉴定[J]. *中国实验诊断学*, 2010, 14(8): 1161-1162.
- [2] 林源,刘绍平,罗汉传,等. VEGF, p53, P21WAF/CIP1 和 C-myc 蛋白表达与肝细胞癌预后关系的研究[J]. *中国普通外科杂志*, 2009, 18(8): 873-876.
- [3] 艾金霞. SBHL 对 HeLa 细胞 c-myc, H-ras 和 hTERT 基因表达的研究[J]. *北华大学学报:自然科学版*, 2009, 10(4): 319-321.
- [4] 黄学兰,徐广贤,贾伟,等. 小鼠 miRNA-203 慢病毒过表达载体的构建及病毒包装与滴度测定[J]. *宁夏医科大学学报*, 2011, 33(7): 605-608.
- [5] Dreyer JL. Lentiviral vector-mediated gene transfer and RNA silencing technology in neuronal dysfunctions[J]. *Methods Mol Biol*, 2010, 614: 3-35.

(收稿日期:2012-12-18)